

백서의 절개 창상에 스테로이드와 베라파밀의
동시주입이 반흔형성에 미치는 영향

"The effect of simultaneous steroid and verapamil
injection on scar formation in the incisional
wound of rat"

Abstract

The effect of simultaneous steroid and verapamil injection on scar formation in the incisional wound of rats

The wound healing in adult mammals is a complex process that inevitably leaves scars. Various treatment modalities have been investigated to minimize the scar formation, and a few of them have been succeeded. Intra-lesional injection of steroids is one of the methods that have been widely accepted for the treatment of specific scars such as keloids or hypertrophic scars. On the other hand, there have been some attempts made to reduce the scar by enhancing the expression of matrix metalloproteinase(MMPs) because it results in degradation of collagens in scar tissues. Verapamil, a calcium channel blocker, was one of the few factors promoting the expression of MMPs such as collagenases by altering the shape of fibroblasts from a bipolar spindle type to a round one. No investigation, however, has been done to elucidate the effect of simultaneous intra-lesional injection of steroid and verapamil to wounds on early scar formation.

To investigate the effect of scar reduction by injecting steroid and verapamil simultaneously, we examined morphologic finding of tissue and we measured width of scar followed by incision wounds treated with normal saline(Control group), steroid(Group A), verapamil(Group B) and both steroid and verapamil(Group C), respectively.

The scar width was significantly reduced in Group B and Group C 2 and 4 weeks after the incision and in Group A 8 weeks after incision, in comparison with control group. At that time the scar width in Group C significant reduced compared to those of other groups. Furthermore the collagen fibers were less, thicker and more regularly arranged in the scar tissue in group C 8 weeks after incision than those in the other groups and their structure was most close to the normal one of the dermis. The contour of fibroblasts in Group B and Group C looked rounder than that in Group A and control group.

In conclusion, simultaneous intra-lesional injection of steroid and verapamil decreases collagen deposition into the wound and subsequently minimize scar width.

Key words : Verapamil, Steroid, Scar, Collagen

I. 서론

인류는 창상에 의한 반흔에 대해서 많은 관심을 가져왔고, 창상치유는 촉진하면서 반흔은 최소화할 수 있는 방법을 찾기 위해 노력 해왔다. 더욱이 사회가 발달하고 생활수준이 향상되어 미용에 대한 관심이 많아지면서 반흔에 대한 치료욕구는 급격히 증가하고 있다.

반흔이란 진피의 심부까지 손상되었던 피부가 치유된 흔적으로 그 유형에 따라 정도의 차이는 있지만 대부분 주변 조직과 다른 색조를 띄거나 융기 또는 함몰되면서 주변과 구분되어 미용상의 문제를 야기 시키고, 경우에 따라서는 동통이나 소양증을 나타내기도 하고 위치에 따라서는 반흔 구축에 의한 관절운동 제약 및 기능에 장애를 일으키기도 한다. 이와 같은 반흔 중에서도 비후성 반흔이나 켈로이드, 화상 구축반흔 등 특이성 반흔을 치료하기 위해 다양한 방법이 사용되어 왔다. 여기에는 생물리학적 방법(biophysical method)인 실리콘젤 판을 이용한 압박요법, 초음파를 이용한 조직온열요법, 저용량 방사선 요법, 약물요법, 레이저 치료, 스테로이드 병변 내 주사, 수술요법 및 이상의 방법을 병행하는 치료법 등이 이용되고 있다.¹ 특히 창상 내 섬유아세포(fibroblast)에서 교원질을 만드는 과정에서 교원질을 구성하는 중요한 아미노산인 프로린(proline)의 수화과정(hydroxylation)을 억제해서 교원질 합성을 억제하고 콜라게나제(collagenase)의 활성을 억제하는 알파투-마크로글로부린(α_2 -macroglobulin)의 작용을 억제시켜 교원질의 분해를 촉진시키는 트리암시노론(triamcinolone)의 병변 내 국소주입은 비후성 반흔 및 켈로이드의 일차적 치료방법으로 여겨져 왔다.^{2,3}

그러나 스테로이드를 짧은 간격으로 반복하여 병변 내 투여할 경우 모세혈관 확장증(telangiectasia), 색소탈실(depigmentation), 피부위축(skin atrophy) 등의 국소적인 부작용과, 다량 투여시 전신적인 부작용이 출현할 수 있고 스테로이드를 주사하였을 때 반응이 없거나, 스테로이드를 사용하는 것이 금기인 경우 이를 대체 할 수 있는 치료법이 필요하나 만족할만한 치료법이 없다.⁴ 최근에는 새로운 치료법을 찾기 위해 창상치유 및 반흔형성에 중요한 역할을 하는 성장인자인 TGF- β 를 억제하는 약물을 국소 주입하여 반흔형성을 줄여보려는 연구가 있었다.³ 또한 기질 단백 분해효소(matrix metalloproteinase, MMPs)의 합성을 촉진하는 약물들을 주입하여 반흔을 줄여 보려는 연구들도 계속되고 있다.¹ 이 중 칼슘 통로 차단제(calcium channel blocker)인 베라파밀은 섬유아세포의 세포막에 존재하는 칼슘통로를 차단함으로써 세포내에서 프로린(proline)이 콜라겐 기질(fibroblast-populated collagen matrix)로 결합하는 것을 감소시켜 교원질의 합성을 억제시킨다는 생리학적 및 임상적 보고가 있었다.⁵ 이에 대한 조직학적 기전으로 베라파밀은 양극성 또는 방추형 모양의 섬유아세포를 구형변화로 유도하는 세포 형태학적 변화(cytomorphologic change)를 유발시켜 섬유아세포에서 교원질 합성을 줄이고 콜라게나제

의 합성을 증가시켜 교원질의 분해를 촉진하는 기전이 알려졌다. 또한 이를 임상적으로 사용하여 베라파밀을 병변 내 국소주입 하여 반흔의 용적을 감소시키고 색감 및 질감의 향상을 보고한 증례가 있었다.⁶ 그러나 베라파밀과 스테로이드를 동시에 국소 주입한 경우에 대한 보고는 없었다.

이에 본 실험에서는 반흔 형성 초기에 베라파밀과 스테로이드를 동시에 백서 진피 내에 국소 주입하여 창상치유 및 반흔형성 정도를 조직계측학적 그리고 조직세포학적으로 분석하고자 하였다. 실험방법으로 대조군과 스테로이드 또는 베라파밀 단독 국소 주입 시 형성되는 반흔의 폭과 이들 약제의 동시 국소 주입시 형성되는 반흔의 폭을 비교 관찰함으로써 두 약제의 동시 사용이 반흔 형성 억제에 더 효과적인지를 알아보하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 실험 동물 및 재료

실험동물은 200-250 gm의 Sprague-Dawley계 백서 30마리를 실험동물로 사용하였고 약제로는 40mg/ml농도의 트리암시노론 아세토나이드 (트리암시노론주, 동광제약, 서울), 2.5mg/ml농도의 베라파밀 (이솅틴주, 일성신약, 서울)을 사용하였으며 창상의 봉합은 5-0 나이론 봉합사(Ethicone, Edinburg, United Kingdom)을 사용하였다.

나. 실험 방법

1) 실험백서 절개창상에 약제 주입

성숙백서에 케타민 (케테라, 유한양행, 서울)을 복강내 투여하여 (35mg/kg) 진신마취하고 배부의 체모를 깎은 후, 소독하여 무균적 상태에서 피부의 창상에 걸리는 장력 균일하게 유지되게 하기 위하여 배부 정중선에서 같은 거리의 사지(limb)근처에 10 mm 길이의 피부 전층 절개를 4부위에 가하였다. 개체에 따른 창상치유의 양상과 반흔 형성의 정도가 차이가 있을 것을 감안하여 한 개체에 대조군과 실험군이 모두 포함될 수 있도록 계획하였다. 이와 함께 백서의 상지부위와 하지부위의 피부의 두께와 긴장력의 차이가 없이 같은 조건이 되도록 실험군을 다음과 같이 분류하였다.

30마리의 백서를 15마리씩 두 개의 그룹으로 분류한 후 제 1그룹의 15마리 성숙백서에서는 좌상부를 대조군으로 정하고 절개 후 생리식염수 0.1cc를 창상연의 진피내에 26G 바늘을 가진 1cc 실린지로 주사한 후 단순봉합만 시행하였다. 좌하부 창상의 실험군 부위에는 2.5mg/ml 농도의 베라파밀 0.1cc와 생리식염수 0.1cc를 창상연의 진피내에 주사한 후 봉합하였다. 우상부 창상의 실험군 부위에는 40mg/ml농도의 트리암시노론 0.1cc와 생

리식염수 0.1cc를, 우하부 창상의 실험군 부위에는 40mg/ml농도의 트리암시노론 0.1cc 와 2.5mg/ml 농도의 베라파밀 0.1cc를 동시에 창상연의 진피에 주사한 후 봉합하였다.

제 2그룹의 15마리의 성숙백서에는 좌하부를 대조군 부위로 정하고 좌상부 창상의 실험군 부위에는 2.5mg/ml 농도의 베라파밀 0.1cc와 생리식염수 0.1cc를 창상연의 진피내에 주사한 후 봉합하였다. 우상부 창상의 실험군 부위에는 40mg/ml 농도의 트리암시노론 0.1cc 와 2.5mg/ml 농도의 베라파밀 0.1cc를 동시에 주사한 후 봉합하였으며 우하부 창상의 실험군 부위에는 40mg/ml농도의 트리암시노론 0.1cc와 생리식염수 0.1cc를 주사한 후 봉합하였다. 절개된 창상은 5-0 나이론 봉합사를 이용하여 봉합하였다.

모든 그룹에서 각 시기마다 각 그룹에서 5마리씩 임의로 선택하여 10마리를 희생시킴으로서 한 개체 내에서 실험군과 대조군이 모두 포함되고 상지부와 하지부에서 같은 표본의 수를 얻었다.

2) 실험백서 표본의 반흔 조직검사

성숙백서는 창상유발 후 2주, 4주, 8주에 제 1그룹과 제 2그룹에서 각각 5마리씩 모두 10마리를 희생하여 조직을 채취하였다. 채취된 조직은 10% 중성 완충 포르마린에 24시간 고정 한 후 통상적인 조직 처리과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 세박절기로 4 μ m 두께로 박절한 후 헤마토시린-에오신 염색 및 결체조직을 관찰하기 위해 트라이크롬으로 염색한 후 표본을 광학 현미경을 이용하여 40배율, 100배율, 400배율로 관찰하였다.

3) 조직표본의 반흔의 폭 측정

조직표본은 창상의 중앙에서 장축에 수직으로 박절하였으며, 제작된 표본을 40배율 광학 현미경 하에서 관찰하였으며 정상진피와 반흔의 경계부의 폭을 이미지 분석 프로그램 (image analysis program; Image-Capture, version 2.0.7, Microsoft)을 이용하여 반흔의 폭을 측정하여 실험군과 대조군의 차이를 비교하였다. 특히 반흔의 폭을 측정할 경우 발생될 수 있는 측정상의 오차를 최소로 하기 위하여 이미지 분석 프로그램에서 보이는 조직 소견을 디지털 영상으로 확대하여 관찰하였다. 반흔 폭의 측정은 먼저 정상 진피와 반흔의 경계를 표시한 후 피부 전층에 걸친 반흔 영역 내에서 표본의 제일 외측 표피층과 진피층에 가장 근접한 근육층에 점을 찍고 이 두 점을 연결하여 피부 전층의 범위를 정하고 이 직선의 정중심에서 수직으로 그은 선과 반흔 경계가 교차하는 점 사이의 거리를 측정하였다. 이 방법은 진피층의 위치에 따라 달리 측정될 수 있는 반흔의 폭을 모든 표본이 일정한 기준에서 측정될 수 있도록 본 실험에서 고안하였다(그림 1). 다른 문헌에서 보고된 방법으로 진피층 내에서 반흔의 폭 중 가장 가는 부분을 측정할 수 있으나⁷ 이 측정방법은 반흔의 모양이 진피층 하부로 진행될수록 좁아지는 역삼각형 모양의 반흔에는

비교가 불가능한 다시 말해, 반흔의 폭이 제로가 되는 측정치를 발생시키므로 사용치 않았다. 본 연구에서 사용된 측정방법은 모든 표본을 가능한 같은 조건에서 반흔의 폭이 측정되도록 함으로서 측정치에 객관성을 줄 수 있었다.

4) 통계처리

상기의 측정과정을 3회 반복 시행한 결과를 평균하여 표본의 최종 측정치로 정하였다. 측정결과는 각 시기에 따른 차이 및 각 군간의 반흔 폭의 차이를 반복 측정 분산분석 (Repeated measured ANOVA test)으로 검증하였고 P값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 평가하였다.

III. 결과

실험한 총 30마리의 백서는 수술적 조작 후 2주, 4주, 8 주에 각각 10마리씩 희생하여 표본 조직을 얻었고 육안적 소견과 이미지 분석 프로그램을 이용한 반흔의 폭 측정 그리고 광학 현미경을 이용한 조직세포학적 소견을 관찰하였다.

가. 시기 별 반흔의 육안적 소견

성숙백서 배부에 유발된 창상은 완전한 반흔의 성숙과정이 이루어지기 전까지는 주위 정상조직과 구별되는 홍반성의 미세하게 융기된 반흔 조직으로 관찰된다.

2주 소견에서는 대조군과 모든 실험군에서 육안적으로 쉽게 반흔을 확인할 수 있었다. 대조군과 스테로이드 투여군에서는 절개선을 중심으로 뚜렷한 반흔이 확인되었으며 베라과 밀 투여군과 두 약제 동시 투여군에서는 그 정도가 대조군과 스테로이드 투여군 보다는 뚜렷하지는 않았으나 육안적으로 쉽게 식별이 가능한 반흔을 보였다.

4주 소견에서도 대조군과 실험군 모두에서 반흔을 확인할 수 있었으나 2주 소견보다 그 정도가 훨씬 경미하였다.

8주 소견에서는 반흔의 성숙과정이 진행되고 있었으며 주위 정상조직과 구별이 되는 홍반성의 미세한 융기가 거의 나타나지 않아 반흔을 육안으로 구분하기 어려웠으나 대조군에서는 반흔이 육안적으로 구별되었다.

나. 시기 별 반흔의 폭에 대한 분석

이미지 분석 프로그램으로 반흔의 폭을 광학 현미경 40배율에서 측정한 결과, 반흔은 주위 정상 진피조직과 확연히 구별되는 치밀한 교원질 침착부위로 관찰되었다.

2주 소견에서 대조군은 평균 $157 \pm 28.41 \mu\text{m}$, 스테로이드 투여군은 $143.93 \pm 23.02 \mu\text{m}$, 베라

파밀 투여군은 $77.01 \pm 24.85 \mu\text{m}$, 스테로이드와 베라파밀 동시 투여군은 $64.13 \pm 21.02 \mu\text{m}$ 였다. ANOVA test 결과 베라파밀 투여군과 두 약제 동시 투여군이 대조군과 스테로이드 투여군에 비해서 통계학적으로 유의한 반흔 폭의 감소 소견을 나타냈다($P < 0.01$). 그러나 베라파밀 투여군과 동시 투여군간의 통계학적인 차이는 없었다($P > 0.1$).

4주 소견에서 반흔의 폭은 모든 군에서 창상치유의 증식기로 판단되는 두터운 반흔이 관찰되었다. 반흔 폭의 측정치는 대조군이 평균 $324.45 \pm 76.66 \mu\text{m}$, 스테로이드 투여군이 $305.06 \pm 59.40 \mu\text{m}$, 베라파밀 투여군이 $182.41 \pm 66.46 \mu\text{m}$, 동시 투여군이 $153.36 \pm 68.53 \mu\text{m}$ 으로 측정되었다. 베라파밀 투여군과 동시 투여군이 대조군과 스테로이드 투여군에 비해 통계학적으로 유의한 반흔 폭의 감소를 보였다($P < 0.01$). 반면 베라파밀 투여군과 동시 투여군 간의 반흔의 폭의 차이에 있어서는 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다($P > 0.1$).

8주 소견에서는 반흔의 폭은 감소하였다. 이는 창상이 성숙기에 도달한 것으로 판단된다. 측정 결과, 대조군은 평균 $135.77 \pm 36.25 \mu\text{m}$, 스테로이드 투여군은 $100.71 \pm 18.47 \mu\text{m}$, 베라파밀 투여군은 $86.18 \pm 21.06 \mu\text{m}$, 동시 투여군은 $42.89 \pm 11.02 \mu\text{m}$ 이었다. ANOVA test 결과 대조군에 비해서 스테로이드 투여군, 베라파밀 투여군, 동시 투여군 모두에서 통계학적으로 유의한 반흔 폭의 감소를 보였다($P < 0.05$). 특히 동시 투여군은 대조군 뿐만 아니라, 스테로이드 단독 투여군, 베라파밀 단독 투여군에 비하여 통계학적으로 의미 있는 반흔 폭의 감소를 나타내었다($P < 0.01$), (표 1).

다. 시기 별 반흔의 조직세포학적 소견

창상 유발 2주 후 창상의 조직은 헤마토시린-에오신 염색의 저배율 소견에서 주위 진피 조직과 확연히 구별되는 반흔 조직이 관찰되었으며 표피층에서 근육층에 이르는 창상의 전형적인 염증반응이 대조군과 모든 실험군에서 관찰되었다. 베라파밀 투여군과 두 약제 동시 투여군에서 염증세포의 침착 정도가 대조군 보다 적었다(그림 3). 고배율 소견에서 대조군과 실험군 모두, 침착된 교원질의 양상은 가늘고 불규칙하였으며 교원질 침착 정도는 대조군과 실험군에서 큰 차이를 보이지 않았다. 대조군에서는 신생 혈관의 증식이 두드러졌으나 다른 실험군에서는 혈관증식은 미약하였다(그림 4).

4주 후 조직학적 소견은 저배율 헤마토시린-에오신 염색에서 실험군과 대조군 모두에서 피부의 전층을 가로지르는 두터운 반흔이 관찰되었다. 대조군에서는 저배율 관찰 시 전층에 걸친 염증세포 침착과 혈관증식이 다른 실험군에 비하여 여전히 뚜렷이 관찰되었으며, 반흔 전반에 걸쳐 교원질의 침착과 교원질 결절도 관찰되었으며 교원질 역시 일정하고 치밀하게 침착되어 균일한 양상을 보였다(그림 5). 고배율 소견에서는 베라파밀 투여군과

동시 투여군에서 대조군과 스테로이드 투여군에 비해서 섬유아세포의 수의 차이는 뚜렷하지는 않았으나 모양에 있어서는 대조군과는 다른 양상의 섬유아세포가 더 많이 관찰되었다. 교원질의 침착은 느슨했으며, 트라이크롬 염색에서도 동일한 교원질 침착 양상을 보였다(그림 6).

8주후 반흔조직은 저배율 헤마토시린-에오신 염색에서 스테로이드 투여군, 베라파밀 투여군, 동시 투여군 모두, 대조군에 비하여 가늘고 미약한 반흔을 형성하고 있었다. 대조군에서도 4주까지 뚜렷했던 염증소견은 사라졌고 섬유화 소견과 교원질 결절의 소견도 관찰할 수 없었다(그림 7). 고배율에서 대조군은 가는 교원질섬유가 치밀하게 침착되어 정상 진피와 확실히 구별되었으나 베라파밀 투여군과 동시 투여군에서는 굵고 균일한 교원질 양상을 나타내었다. 특히 동시 투여군은 교원질 섬유의 양상이 베라파밀 투여군보다 더 굵고 규칙적으로 배열되어 주위 정상 진피 소견과 비슷한 양상을 보였다. 또 고배율에서는 대조군에서 많은 섬유아세포가 관찰되었고 그 모양은 양극성의 방추형 모양이 대부분이었다. 그러나 베라파밀 투여군과 동시 투여군에서는 4주째에 증가되었던 섬유아세포의 수가 현저히 감소하였다(그림 8).

IV. 고찰

포유류의 창상치유 과정(wound healing process)은 다양한 세포들의 일련의 복잡한 과정에 의해 이루어지는 반흔 형성의 과정을 통해서 이루어진다. 이러한 창상치유 과정은 염증기(inflammatory phase), 증식기(proliferative phase), 재형성기(remodeling phase)의 단계를 거친다. 염증기에서는 손상된 조직을 제거하고 면역학적인 방어체계를 회복하기 위한 단계로 혈관이 확장되고 투과성이 증가함에 따라 혈장과 백혈구가 조직으로 빠져나가고 다양한 성장인자(growth factor), 세포활성물질(cytokine)을 분비하며 또 대식세포(macrophage)가 출현하여 섬유아세포를 유인하는 성장호르몬을 분비한다. 염증기가 진행됨에 따라 세포외기질의 분해산물(degenerative products of extracellular matrix), 혈소판 유도 성장인자(platelet derived growth factor, PDGF), 표피 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 변형 성장인자(transforming growth factor, TGF)등과 같은 세포활성물질 등이 분비되어 창상치유의 두번째 단계인 증식기를 시작시킨다. 증식기에는 섬유아세포와 표피세포가 중요한 역할을 하며 재상피화(re-epithelization), 기질세포의 증식, 세포외기질의 합성, 창상수축, 신생혈관화(neovascularization) 등이 일어나게 된다. 이 시기에 반흔형성이 시작되고 반흔조직은 세포외기질중 교원질이 대부분을 차지하고 있다. 다시 말해서 반흔은 창상치유 과정에서 발생된 과다 형성 단백질이라 볼 수 있으며 반흔 조직에서 발견되는 단백질의 50%이상은 교원질로 구성되어 있다. 결국 반흔은 교원질이 과다 생성된

조직이라고 볼 수 있다. 교원질은 섬유아세포에 의해 형성되며 세포외기질은 창상유발 후 3-4주에 가장 활발하며 교원질의 양은 6주에 가장 많다.^{1,3,8}

이와 같이 성숙개체에서는 창상치유가 진행되면서 필연적으로 반흔이 형성되는데 이러한 반흔을 최소화하기 위해서 다양한 방법이 연구되어왔다. 특히 비후성반흔과 켈로이드 치료에 있어서는 다양한 방법이 복합적으로 시도되고 있는데, 그 중에서 스테로이드의 병변 내 국소 주입이 가장 널리 이용되고 있는 치료법이다.^{1,3}

스테로이드는 창상치유 단계 중 수상 후 약 3-5일 후부터 시작되어 3-6주간 진행되는 증식기에 섬유아세포가 교원질의 합성을 유도하는 과정에서 교원질이 안정된 구조물로 되기 위한 필수 단계인 프로린의 수화과정(hydroxylation)에 관여하는 효소인 프로릴 하이드록시라제(prolyl-hydroxylase)를 억제해서 안정된 프로콜라겐(procollagen)의 합성을 방해함으로써 결국 교원질 섬유의 안정되고 견고한 교차결합(cross-linking)을 이루는 것을 방해한다. 이로 인해 교원질의 합성이 억제되며 또한 교원질을 분해하는 효소인 콜라게나제의 강력한 억제제인 알파투-마크로글로부린(α_2 -macroglobuline)과 알파원-안티트립신(α_1 -antitrypsin)을 감소시켜 교원질의 분해를 유도한다.^{2,3}

베라파밀은 칼슘 통로 차단제로서 고혈압과 부정맥과 같은 심혈관계 질환을 치료하는 약물로 널리 사용되지만 섬유아세포에 작용하는 기전이 연구되면서 교원질 생성을 조절하는 역할을 하는 것이 밝혀지고 있다.^{9,10} 그 조절 기전은 교원질의 합성을 억제하고 분해를 촉진시키는 기전인데 베라파밀은 교원질 분해의 기전이 더 크게 발현된다고 보고되고 있다¹. 즉 섬유아세포는 세포의 형태학적 변화(cytomorphologic change)에 따라 교원질의 합성과 증식이 밀접하게 연관되어 있는데 칼슘 길항제의 일종인 칼모듈린 억제제(calmodulin inhibitor)는 세포질 내의 액틴 필라멘트(actin filament)를 탈중합 반응(depolymerization)시킴으로서 섬유아세포의 구형변화(cell rounding)를 초래한다. 이러한 섬유아세포의 형태학적 변화가 콜라게나제(collagenase)와 같은 기질 단백 분해효소(matrix metalloproteinase, MMPs)의 유전인자 발현을 증가시켜, 교원질의 분해를 촉진시킨다고 보고되었다.^{1,9-11} 기질 단백 분해효소는 세포의 유착, 이동, 증식 및 분화에 중요한 역할을 하는 세포외기질과 교원질을 분해하는 역할을 하며 최근 연구에 의하면 기질 단백 분해효소는 콜라게나제(collagenase, MMP-1), 젤라티나제 에이(gelatinase A, MMP-2), 매트리라이신(matrilysin, MMP-7), 젤라티나제 비(gelatinase B, MMP-9)등으로 나뉘지며, 이들은 여러 세포에서 분비되어 창상 기질의 분해와 재형성에 관여함으로서 반흔 형성에 영향을 주며 단백 분해효소의 조직 억제제(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)에 의해 억제되는 단백 분해효소이다. 이러한 기질 단백 분해효소는 교원질 뿐만 아니라 탄력소(elastin), 파이프록넥틴(fibronectin), 프로테오글라이칸(proteoglycan)등과 같은 여러 가지 세포외기질의 분해에도 관여하는 것으로 알려져 있다.^{12,13} 한편 단백질 키

닌효소 C 억제제(protein kinase C inhibitor)가 칼모둘린 억제제와 같은 작용을 하는 것이 밝혀졌고 단백질 키나효소 C 억제제인 베라파밀은 세포형태학적으로 섬유아세포의 모양을 변화시켜 콜라게나제와 같은 기질 단백 분해효소(matrix metalloproteinase, MMPs)의 생산을 유도하여 교원질 분해를 촉진시킨다고 알려져 있다.¹ 실제로 베라파밀에 2시간 노출시켜 36시간 배양한 섬유아세포에서 프로콜라게나제(procollagenase)의 합성이 증가됨을 보여주는 보고도 있었다.¹ 칼슘 길항제에 의해서 섬유아세포의 모양이 구형으로 변화하면 그 변화된 세포의 60% 이상에서 콜라게나제의 발현이 증가됨이 밝혀졌다.⁹ 특히 세포모양의 변화에는 액틴 필라멘트(actin filament)의 탈중합 반응(depolymerization)이 중요한 역할을 하며 또한 이것이 콜라게나제의 유전인자 발현에 중요한 역할을 할 것으로 추측되고 있으나 아직 생화학적 기전은 밝혀지지 않았다.¹⁰ 또한 베라파밀은 교원질의 합성을 억제하는 기전도 있다. 즉 진피의 섬유아세포는 세포막에 칼슘통로를 가지고 있는데 베라파밀은 이 칼슘통로를 차단함으로써 세포 내에서 프로린(proline)이 콜라겐 기질(fibroblast-populated collagen matrix)로 결합하는 것을 50-60%까지 감소시켜 교원질의 합성도 억제시킨다고 보고되고 있다.⁵

본 연구에서는 반흔조직의 표본 채취를 2주, 4주, 8주에 시행하였다. 이는 본 연구의 목적인 스테로이드와 베라파밀의 작용이 창상치유 과정의 염증기, 증식기, 재형성기라는 각각의 과정에서 관찰하기 위함이었다. 2주째의 반흔 폭에 대한 결과는 베라파밀 투여군과 동시 투여군이 대조군과 스테로이드 투여군에 비하여 측정치가 적게 나타났다. 이는 스테로이드의 주된 작용이 창상으로 이동된 섬유아세포에서 교원질의 합성을 억제하는 것이므로 증식기를 거치면서 교원질의 합성과 분해가 평형을 이루게되는 시점에서 그때부터 교원질 합성이 우세하게 감소하면서 반흔이 점차적으로 작아지게 된다.^{3,10} 2주째의 결과는 시기적으로 스테로이드의 작용이 나타나지 않아 대조군과 스테로이드 투여군에서는 반흔의 폭이 크게 측정되었다고 여겨진다.

본 실험에서도 전형적인 창상치유 과정과 동일하게 4주까지는 창상치유의 증식기로 기질 세포가 증가하고 세포외기질의 생산이 많으며 신생혈관화가 활발한 단계로 관찰되었다. 4주째의 본 연구의 결과는 2주째 결과와 유사하게 동시 투여군은 대조군과 스테로이드 투여군 보다는 반흔의 폭이 작았으나 베라파밀 투여군과는 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 증식기에는 스테로이드나 베라파밀 등의 교원질 침착 억제효과가 의의있게 발현되지 못한 것으로 여겨진다. 또한 교원질의 차이보다는 기질세포와 세포외기질의 증식이 반흔의 폭에는 더 큰 영향을 주는 것으로 판단된다. 반흔의 폭은 교원질의 합성이 최대가 되는 6주를 지나면서 교원질의 합성과 분해가 평형을 이루면서 창상의 재형성 단계를 거치며 이 과정부터 교원질에 의해서 주로 반흔의 폭이 결정된다. 본 연구결과에서 스테로이드 투여군이 대조군에 비해 의의있는 반흔의 폭 감소를 보인 것이 8주째에 나타난 것은 이러한

창상치유 과정에 기인한 것으로 분석된다. 여기까지의 결과는 이미 알려진 스테로이드나 베라파밀의 반흔에서 교원질 감소 효과와 동일하다고 할 수 있다.

그러나 8주째 나타난 스테로이드와 베라파밀 동시 투여군의 현저한 반흔의 감소는 다른 모든군과 비교하여 통계적으로 의의가 있었다. 이러한 결과의 생리화학적 기전을 추측하면 초기 베라파밀의 작용으로 섬유아세포의 형태변화와 콜라게나제와 같은 단백 분해효소의 직접적인 발현으로 교원질 분해를 촉진시키고 좀더 후기에 출현되는 스테로이드의 교원질 합성 억제 기전으로 반흔의 감소가 병합적으로 발생하였다고 할 수 있을 것이다. 또한 8주 소견에서 스테로이드 투여군과 베라파밀 투여군간에는 반흔의 폭에 있어서는 측정한 평균치는 베라파밀 투여군이 감소되어 나타났으나 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않아($P>0.05$) 어느 약제가 더 우월한 반흔 형성 억제기전이 있는지는 판단하기 어려웠다. 창상유발 8주 후 조직학적 소견에서도 베라파밀 투여군과 동시투여군에서 고배율 소견상에 보이는 섬유아세포의 모양이 대조군과 스테로이드 투여군에서 보여지는 방추형의 양극성 모양과는 다른 양상을 나타냈으나 이를 베라파밀에 의한 세포형태학적 변화로 단정할 수는 없었다. 또한 동시투여군의 반흔의 교원질 침착 양상은 스테로이드 투여군이나 베라파밀 투여군 보다도 더 굵고 균일하며 느슨한 침착을 보여 주위 진피 조직에 가장 유사한 소견을 나타냈는데 이는 스테로이드와 베라파밀의 반흔억제 작용이 병합되어 나타난 결과라고 추측할 수 있다.

본 연구의 결과로 칼슘 통로 차단제인 베라파밀이 반흔형성을 억제하는 작용이 있고 스테로이드와 함께 사용될 경우 반흔형성이 이들 약제의 단독 투여때 보다 더 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 이 약물들의 상호작용과 6개월 이상의 반흔 재형성 기간까지 이들 약물의 반흔형성 억제작용이 계속 지속될지 여부에 대해서는 추가적인 연구가 필요하나 반흔형성 억제 치료제로서 스테로이드와 베라파밀의 동시 사용이 효과적일 수 있다는 실험적 근거를 제시했다고 사료된다.

V. 결론

성숙백서 배부에 유발한 창상에 칼슘 통로 차단제인 베라파밀과 스테로이드를 동시에 국소 주입하여 봉합한 후 2주, 4주, 8주에 조직을 채취하여 헤마토시린-에오신과 트라이크롬 염색을 한 표본을 현미경 관찰에 의한 조직 세포학적 소견과 이미지 분석 프로그램을 이용하여 반흔의 폭을 측정한 조직 계측학적 분석을 종합하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 창상유발 2주, 4주, 8주 전시기에 걸쳐서 동시 투여군이 대조군과 스테로이드 투여군에 비하여 통계학적으로 의미 있는 반흔 폭의 감소를 나타냈다.
2. 창상 유발 8주 소견에서는 동시 투여군은 대조군, 스테로이드 투여군 뿐만 아니라 베라파밀 투여군에 대해서도 통계학적으로 유의한 반흔 폭의 감소를 나타냈다.
3. 창상유발 2주, 4주, 8주에 트라이크롬 염색을 시행한 조직표본의 현미경 소견에서 동시 투여군의 교원질 침착이 대조군과 스테로이드 투여군에 비해서 적었다.
4. 특히 창상유발 8주 소견에서 동시 투여군의 창상 조직의 교원질 섬유는 베라파밀 투여군의 교원질 섬유보다도 더 굵고 규칙적이었으며 주위 정상 진피의 교원질 섬유와 가장 유사한 양상을 보였다.

이상의 결과로 베라파밀은 백서의 창상에서 반흔형성을 감소시켰으며 스테로이드와 함께 투여했을 때는 반흔 형성을 감소시키는 효과가 더 크게 나타남을 알 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Su CW, Alizadeh K, Booddie A, Lee RC: The problem scar. Clin Plast Surg 98:456-464, 1998
2. Murray RD: Kenalog and the treatment of hypertrophied scar and keloid in negroes and whites. Plast Reconstr Surg 31:275-280, 1963
3. Frank BN, Paul HM, Joost S, Moshe K: On the nature of hypertrophic scar and keloid: A review. Plast Reconstr Surg 104:1435-1449, 1999
4. Gahankari D, Rana RE, Tambwekar SR: An unusual complication following intralesional triamcinolone injection. Plast Reconstr Surg 97: 1076, 1996
5. Lee RC, Ping J: Calcium antagonist retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. J Surg Res 49: 463-465, 1990
6. Lee RC, Doong H, Jelleman A: The response of burn scar to intralesional verapamil. Arch Surg 129: 107-111, 1994
7. Daniela Q, Lillian BN, Jeffrey AD, Jeffrey MD: Transforming growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin: Incisional wound model. J Invest Dermatol 97:34-42, 1991
8. Lawrence WT: Physiology of the acute wound. Clin Plast Surg 98:330-331, 1998
9. Aggeler J, Frisch SH: Change in the cell shape correlate with collagenase gene expression in rabbit synovial fibroblast. J Cell Biol.98:1662-1671, 1984
10. Doong H, Dissanayake S, Gowrshankar TR, Labarbera MC, Lee RC: Calcium antagonist alter cell shape and induce procollagenase synthesis in keloid and normal human dermal fibroblast. J Burn Care Rehabil 17:497-514, 1996
11. Veredi M, Tredget EE, Scott PG, Shen YJ, Ghahary A: Alteration in cell morphology triggers transforming growth factor-B1, collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinase-I expression in normal and hypertrophic scar fibroblast. J Invest Dermatol 104:118-123, 1995
12. Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW,, Ting K: Defferential expression of matrix metalloproteinase and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. Plast Reconstr Surg 105:638-647, 2000
13. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implication. J Clin Oncol 18:1135-1149, 2000

부도설명(Legend)

Table I. Average Width of Scar in Tissue Samples.

	Control (N=10)	Steroid (N=10)	Verapamil (N=10)	Steroid + Verapamil (N=10)	Width : mean \pm standard deviation
<i>2 weeks</i>	<u>157.14</u> ± 28.41	<u>143.93</u> ± 23.02	<u>77.01</u> ± 24.85	<u>64.13</u> ± 21.02	Unit: μm
<i>4 weeks</i>	<u>324.45</u> ± 76.66	<u>305.06</u> ± 59.40	<u>182.41</u> ± 66.46	<u>153.36</u> ± 68.53	N: number of samples
<i>8 weeks</i>	<u>135.77</u> ± 36.25	<u>100.71</u> ± 18.47	<u>86.18</u> ± 21.06	<u>42.89</u> ± 11.02	

Fig. 1. Measurement method of scar width in tissue samples. After marking of boundary between scar and normal tissue, the full thickness of skin including epidermis and dermis except muscle layer is marked by linear line with image analysis program. From the midpoint of this line, the perpendicular line is marked to cross with the boundary of scar and the length of two crossing point is measured into scar width.

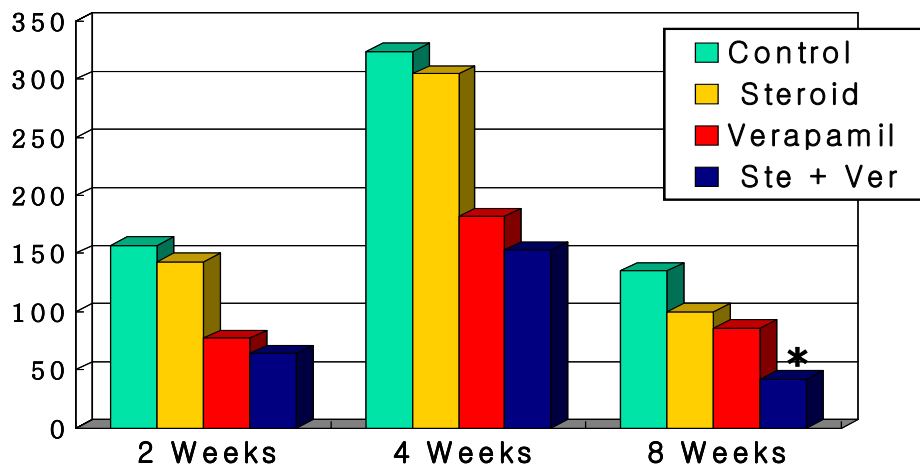


Fig. 2. Comparison of scar width of tissue samples. On 8 weeks, the simultaneous steroid & verapamil injected group(*) has a statistical significance in reduction of scar width compared to that of other group including verapamil injected group($P < 0.01$).

Fig. 3. Microscopic finding(H-E stain, X40) at 2nd week. The scar width(→ ← marking area) crossing full thickness dermal layer in control and steroid injected group was thicker than that of verapamil and simultaneous steroid & verapamil injected group. The infiltration of inflammatory cell was prominent in control group. (Above, left) Control group, (Above, right) Steriod injected group, (Below, left) Verapamil injected group, (Below, right) simultaneous steroid & verapamil injected group.

Fig. 4. Microscopic finding(H-E stain, X400) at 2nd week. The scar width was thin in verapamil and simultaneous steroid & verapamil injected group but the amount of collagen deposition was similar to that of control and steroid injected group. In control group, the prominent infiltration of inflammatory cell and many neovascularization were noted. But the infiltration of inflammatory cell in simultaneous steroid & verapamil injected group was weak. (Above, left) Control group, (Above, right) Steriod injected group, (Below, left) Verapamil injected group, (Below, right) simultaneous steroid & verapamil injected group.

Fig. 5. Microscopic finding(H-E staining, X40) at 4th week. The scar width(→ ← marking area) crossing full thickness dermal layer in control and all other experimental groups became thick. The prominent increase in scar width was noted in control and steroid injected group compared to that of 2nd week finding. The infiltration of inflammatory cell was still prominent in control group. (Above, left) Control group, (Above, Right) Steriod injected group, (Below, left) Verapamil injected group, (Below, right) simultaneous steroid & verapamil injected group.

Fig. 6. Microscopic finding(H-E staining, X400) at 4th week. The deposition of collagen fiber in control group was more prominent than that of other experimental groups and the infiltration of inflammatory cell increased compared to 2nd week finding in control group. The amount of collagen deposition in verapamil and simultaneous steroid & verapamil injected group was similar with each other but more loose than that of control group. (Above, left) Control group, (Above, right) Steriod injected group, (Below, left) Verapamil injected group, (Below, right) simultaneous steroid & verapamil injected group.

Fig. 7. Microscopic finding(H-E staining, X40) at 8th week. The scar width(→← marking area) crossing full thickness dermal layer in control and all other experimental groups was reduced compared to that of 4th week finding but the prominent and thick scar was noted in control group. The thin and indistinguishable scar from normal dermis was noted in simultaneous steroid & verapamil injected group. (Above, left) Control group, (Above, right) Steriod injected group, (Below, left) Verapamil injected group, (Below, right) Simultaneous steroid & verapamil injected group.

Fig. 8. Microscopic finding(H-E stain, X400) at 8th week. The deposition of thin and irregular collagen fibers in control group was denser than that of other experimental groups and many spindle shaped fibroblasts were scattered. The number of fibroblasts in verapamil and simultaneous steroid & verapamil injected group decreased and contour of cell was relatively different compared to those of control group. Especially the collagen fibers were more thicker and more regularly arranged in simultaneous steroid & verapamil injected group than those in the other groups and their structure was most close to the normal one of dermis. (Above, left) Control group, (Above, right) Steriod injected group, (Below, left) Verapamil injected group, (Below, right) simultaneous steroid & verapamil injected group.